

【S-5】

조인스의 안전성 연구 : 단회/반복투여 독성 및 위장관에 미치는 영향

류근호

SK케미칼 생명과학연구소 책임연구원

일반적으로 퇴행성관절염과 류마티스관절염으로 대별되는 관절염 질환은 다양한 자극 즉, 무리한 반복사용, 고령화, 외상 등에 의한 물리적 자극과 염증반응 매개물에 의한 화학적 자극에 기인하여 궁극적으로는 관절연골조직이 파괴되어 비가역적으로 관절 고유의 기능을 상실하는 질환이다. 이는 병태생리학적인 관점에서 볼 때, 그 원인과 증상이 매우 다양하여 그 발병원인을 한, 두 가지로 규정하기란 쉽지 않은 일이다. 따라서 지금까지는 관절염의 근본적 원인치료나 관절염의 진행을 억제시킬 수 있는 이상적인 약제가 개발되지 않아 일반적으로 스테로이드 및 비스테로이드성 소염진통제 (NSAIDs)에 의존하여 왔다. 그러나 서양의학의 관점에서 개발된 이들 소염진통제는 단순한 대증요법제로 염증과 통증만을 억제할 뿐 연골조직 보호 등의 근본적 치료가 불가능하고 장기간 복용 시에는 소화불량, 위염, 위, 십이지장궤양과 같은 위장관 장애 및 고혈압, 신장기능 감소 등과 같은 부작용을 유발하는데 관절염 환자의 대부분이 노년층이란 측면에서 많은 문제점을 내포하고 있는 실정이다.

SK케미칼 및 SK제약에서는 관절염의 증상으로 나타나는 통증을 억제할 뿐만 아니라, 관절염의 원인인 연골 파괴를 억제하여, 관절염을 효과적으로 치료할 수 있는 약물을 개발하고자 하였다. 다양한 인자가 관여하는 관절염의 특성상 단일 기전에 작용하는 합성의약품보다는 천연물 신약이 관절염 치료제로 더 적절하다고 판단하여, 기성한약서 및 약리, 생리활성이 보고 된 과학 잡지 등을 참고하여 관절염 질환에 유의적으로 작용 할 가능성이 높은 것으로 알려진 60여종의 생약을 선별하였다. 이들 생약의 추출물에 대한 소염, 진통, 혈액순환 개선 및 관절조직 분해효소 억제 활성을 정량적으로 검정하여 신규 생약복합제 관절염치료제 (코드명: SKI306X, 상품명: 조인스)를 개발하였다.

조인스는 위령선, 과루근 및 하고초 3종의 1:2:1 혼합 추출정제물로서 각종 소염, 진통, 관절염 모델에서 우수한 약효를 나타내었다. 아울러 최근 들어 관심이 증폭되고 있는, 관절연골에 대한 영향을 평가하고자, 관절연골 배양 시험과 관절내 collagenase 주입 모델 시험을 수행하였다. 소, 토끼, 돼지의 연골 배양시험에서 조인스는 IL-1 α

에 의한 연골 파괴를 유의적으로 억제하였다. 또한 *in vivo* 모델인 collagenase 투여 시험에서는 토끼 관절강에 collagenase 투여에 의하여 사람의 골관절염과 유사한 병리조직학적 병변이 유발되었으며, 이러한 변화는 NSAIDs의 일종인 diclofenac의 경우 유의적인 효과가 없었으나, 조인스 투여군에서는 통계적으로 유의하게 병변이 줄어들었다. 특히 관절연골 배양시험시 lactate, LDH assay를 통해 세포 독성 유무를 확인하였는데, 본 약물은 세포 독성이 없는 것으로 나타났고, collagenase 투여 모델에서도 독성과 관련된 병리조직학적 변화는 관찰되지 않았다

이러한 조인스의 약리작용은 5-lipoxygenase, cyclooxygenase expression, iNO synthase, human TNF- α expression에 대한 억제 작용과 항산화작용, aggrecanase, MMPs 활성 억제 및 MMPs 활성화 억제 그리고 MMPs expression 억제 작용이 관여하는 것으로 나타났다.

본 관절염 치료제의 안전성을 확인하기 위해, 랫드에서의 단회투여 독성시험 및 4주/26주 반복투여 독성시험을 수행하였다.

단회투여 독성시험은 SD 암·수 랫드에 대조군과 5.0 g/kg을 최고 용량으로 하고 공비를 0.66으로 하여 모두 5개의 투여 용량군을 설정하였다. 단회 투여 후 매일 임상증상 및 사망관찰, 체중변화를 관찰하였고, 14일간의 관찰기간이 끝난 후 부검하여 외관 및 내부 장기의 이상 유무를 육안적으로 상세히 관찰하였다. 조인스는 모든 투여군에서 폐사 및 비정상적인 임상증상이 관찰되지 않았고, 모든 약물 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있는 체중 변화가 나타나지 않았다. 또한 부검 소견에서도 이상 증상이 발견되지 않았다. 단회투여 독성시험에서 조인스는 LD₅₀가 5 g/kg 이상으로 매우 안전한 약물인 것으로 나타났다.

반복투여시의 안전성을 검토하기 위해 SD 암·수 랫드에 0.3, 1.0, 및 3.0 g/kg/day의 용량으로 4주간 경구 투여하면서 안전성을 평가하였다. 본 시험시 투여기간에 따른 독성 평가를 위한 2주 반복 투여군과 독성의 가역성을 평가하기 위한 2주 회복군도 설정하였다. 본 시험에서 치사 동물 및 비정상적 임상 증상을 나타내는 동물은 발견되지 않았다. 수컷 랫드의 최고 용량 투여군에서 5% 이내의 체중감소가 관찰되었으나, 2주 회복기간동안 회복되었다. 혈액학적 지표에서는 2주 투여군에서 모든 용량의 암컷 랫드에서 적혈구의 유의적 감소 현상이 나타났으나, 4주 투여군이나 회복군에서는 발견되지 않았다. 혈액생화학적 분석에서는 몇몇 지표에서 대조군과 비교하여 유의적 변화가 나타났으나, 모두 정상 범위내였으며, 용량의존성은 없었다. 절대장기 및 상대 장기 중량 측정에서 일부 장기가 대조군에 비해 유의성 있는 변화를 보였으나, 용량의존성 및 투여 기간과의 상관성은 나타나지 않았고, 회복군에서 회복되었다. 부검 후 조직검사에서는 특이한 이상 소견이 발견되지 않았다. 이상의 결과로부터 조인

스의 4주 반복투여 독성시험에서 무해용량은 0.3 g/kg/day ~1.0 g/kg/day 사이이고, 최대 내성용량은 3.0 g/kg/day 이상일 것으로 추정된다. 26주 반복투여 독성시험시의 투여용량 결정을 위해 GLP하에 시험한 4주 반복투여 용량결정시험에도, 조인스는 3 g/kg/day까지 유의한 독성을 나타내지 않았다.

또한 관절염치료제가 장기간 투여되는 약물임을 감안하여, 26주 반복투여 독성시험을 수행하였다. 5주령 SD 암수 랫드에 0 (대조군), 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day의 용량으로 26주간 경구 투여하였고, 독성의 가역성을 평가하기 위해 4주간의 회복기간을 두었다. 관찰기간동안 시험약물과 관련된 사망은 관찰되지 않았다. 암수 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서 투여 9주째부터 26주째까지 시험물질의 과량 투여에 기인한 연변 또는 설사증상이 관찰되었으나, 이는 투여된 물질이 위장관 통과시에만 나타나는 일과성 현상으로 초기 통과 이후에는 나타나지 않았고, 회복기간동안에는 관찰되지 않았다. 수컷 2,000 mg/kg/day 투여군에서는 체중증가 억제 경향이 관찰되었다. 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사 결과에서는 일부 항목이 대조군과 비교하여 유의적인 차이를 나타내었지만, 정상 생리학적 범위내의 미미한 정도만 관찰되었다. 특히 간장과 관련된 ALT, AST 등의 지표는 대조군과 비교하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 장기 중량에서 2,000 mg/kg/day 투여군에서 간, 신장, 및 고환이 유의성 있게 증가하였으나 조직병리학적 검사결과 특이한 소견은 관찰되지 않았다. 간조직의 경우, 간세포 비대 소견이 용량 의존적으로 관찰되었으나, 이는 정상적인 간장의 대사기능 증가에 따른 영향으로 판단되며, 회복군에서 회복되었다. 이상으로 암수 랫드를 이용한 26주 경구 반복투여 독성시험을 실시한 결과, 500 mg/kg/day 투여군에서는 대조군에 비하여 전혀 변화를 관찰할 수 없었으며, 1,000 및 2,000 mg/kg/day 투여군에서 관찰된 일반증상으로서 연변 또는 설사가 관찰되었으나 시험물질의 물리적인 현상에 의한 것으로 판단되며, 장기중량에서 관찰된 간장 중량의 증가는 혈액생화학적 검사와 병리조직학적 소견으로 볼 때, 간의 정상적인 대사기능 증가에 의한 변화로 사료되었다. 상기의 결론으로 본 시험에서의 무해용량 (NOEL)은 암수 공히 500 mg/kg/day으로, 최대내성용량은 2,000 mg/kg/day 이상으로 나타나 매우 안전한 약물로 판단되었다.

한방 처방이나 천연물 신약의 경우 많은 성분으로 인해 간독성에 대한 우려와 합성의약품과의 약물 상호작용에 대한 관심이 많기 때문에, 대표적인 약물대사 효소인 cytochrome P450 효소 활성화에 미치는 영향을 평가하였다. 조인스를 50, 200, 그리고 800 mg/kg 용량으로 매일 1회 일주일간 수컷 랫드에 경구로 투여 후 CYP1A2, CYP2B1/2, CYP2C11, CYP2E1, 그리고 CYP3A1/2 발현 변화를 Western blot으로 확인하였다. 조인스는 모든 투여용량에서 total cytochrome P450과 CYP isozyme의 발현량에는 대조군과 비교하여

유의성 있는 차이를 보여주지 않았다. 또한 human liver microsomes에서 CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, 그리고 CYP3A4에 특이적인 기질을 사용하여 각 isozyme의 활성 억제효과 검증 시험에서도, 조인스는 체내에서 약물상호작용 유발 가능성이 매우 낮은 것으로 나타났다.

관절염치료제로서 널리 사용되는 NSAIDs 계열의 약물의 주요한 부작용으로는 위궤양 유발이 알려져 있다. 따라서 조인스의 위궤양 유발 가능성과 대표적인 NASIDs 계열의 약물인 diclofenac에 의한 위궤양 유발시 조인스를 병용 투여했을 때의 위장보호 작용이 있는지 시험하였다. Diclofenac의 경우 단회 혹은 반복투여시 위궤양을 심하게 유발한데 반해, 조인스는 최고 2.0g/kg까지 위장관에 영향이 없었다. 또한 diclofenac 투여로 유발된 위궤양이 조인스를 병용 투여한 후 현저히 억제되는 것으로 나타나 조인스가 diclofenac에 의한 위장장애에 보호 효과가 있는 것으로 나타났다. 기전 연구를 위해 위궤양을 유발하는데 중요한 역할을 하는 LTB₄와 위장 보호 역할을 하는 PGE₂의 양을 측정시, 조인스는 LTB₄의 수치는 낮추고, PGE₂의 양은 유지하거나 약간 상승시키는 것으로 나타났다.

이상의 전임상 결과 등을 토대로 보건복지부로부터 임상시험 조건부 의약품 품목 허가를 취득하여 제 2상 임상시험을 수행함으로써 최적 용법,용량을 확립 (200 mg *t.i.d.*)하였고, 이 용법,용량에서 100 mm VAS (Visual Analogue Scale) 값의 감소 정도를 평가함으로써 인체에 우수한 약효 (Placebo vs. 조인스 : 4.5 ± 6.8 vs. -23.6 ± 16.3)를 발현 하였을 뿐만 아니라 Placebo군과 비슷하거나 오히려 낮은 부작용 발생 빈도 및 중증도를 보여 매우 안전한 약물임을 입증하였다. 이어서 진행된 제 3상 임상시험에서는 전 세계적으로 가장 많이 사용되고 있는 NSAIDs 약물 중에 하나인 Diclofenac 제제 (불타렌 서방정)와 양측눈가림, 무작위배정, 다기관공동 비교임상을 수행한 결과 소염, 진통 약효 발현에 있어 동등성을 확인할 수 있었으며, 위장관계 부작용을 포함한 부작용 발생율에 있어 조인스가 Diclofenac 서방형 제제보다 시험약물 관련 이상반응 발생율이 통계적으로 유의하게 현저히 낮음을 확인할 수 있었다.

이상과 같이 조인스는 관절염 치료에 있어서 기존의 대증요법에 국한되지 않고 관절연골 조직보호 작용, 혈액순환 촉진, 면역 조절 등의 근본적 원인 치료 및 질환의 진행 억제에 대한 방향을 제시했다는 약리학적 측면뿐 아니라, 안전성 연구 측면에서도, 26주 반복투여를 통해 안전성을 확인하였으며, 약물 상호작용을 고려하여, 간대사 효소에 대한 영향을 평가하였으며, 기존 NSAIDs 약물의 약점으로 지적되는 위장관계 부작용에 대한 실험을 통해 안전성 및 보호 작용을 확인했다는 점에서 그 의의가 크다고 하겠다.